

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jitka Vojáčková

Vnitřní terminace transkripce vícepodjednotkových RNA polymeráz
Intrinsic transcription termination by multisubunit RNA polymerases

Bakalářská práce

Školitel: **Mgr. Michal Sýkora**

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 5. 2017

.....
Jitka Vojáčková

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat všem členům Laboratoře biochemie RNA, vedené RNDr. Martinem Pospíškem, Ph.D., a zejména pak mému školiteli Mgr. Michalu Sýkorovi a konzultantovi Mgr. Václavovi Vopálenskému, Ph.D. za obětavé a přínosné vedení této práce a uvedení do laboratorní praxe. Dále bych chtěla poděkovat celé své rodině za finanční i morální podporu během mého studia.

Abstrakt

Transkripce je proces, při kterém dochází k přepisu genetické informace z DNA sekvence do RNA kopie pomocí DNA dependentní RNA polymerázy. U bakterií jsou známy dva způsoby terminace transkripce: vnitřní terminace transkripce, která nevyžaduje žádné další přídatné faktory, a terminace závislá na proteinovém faktoru Rho.

Vnitřní terminace transkripce je běžná hlavně u bakterií, ale odlišné, i když částečně podobné formy vnitřní terminace transkripce se vyskytují i u eukaryot a archea. Tato práce udává stručný přehled struktury RNA polymerázy a stability elongačního komplexu, popisuje jednotlivé kroky mechanismu vnitřní terminace transkripce u bakterií včetně jejich dnes diskutovaných modelů a udává příklady vnitřní terminace transkripce u eukaryot a archea a jejich porovnání s bakteriálním mechanismem vnitřní terminace transkripce.

Klíčová slova: RNA polymeráza, elongační komplex, vnitřní terminace transkripce, vlásenkové RNA struktury

Abstract

Transcription is a process of genetic information rewriting from DNA sequence to RNA copy by DNA dependent RNA polymerase. Two mechanisms of transcription termination are known for bacteria: intrinsic transcription termination, independent of any accessory factors, and transcription termination dependent on protein factor called Rho.

Intrinsic transcription termination is common mainly for bacteria, yet different, but partially similar forms of intrinsic transcription termination occur also in eukaryotes and archaea. This thesis includes a brief summary of RNA polymerase structure and elongation complex stability, describes individual steps of intrinsic transcription termination mechanism in bacteria including all discussed models and gives examples of intrinsic transcription termination in eukaryotes and archaea and their comparison with bacterial model of intrinsic transcription termination.

Key words: RNA polymerase, elongation complex, intrinsic transcription termination, hairpin RNA structures

Seznam použitých zkratk a termínů

5S rRNA	5S ribosomal RNA	5S ribozomální RNA
A	Adenine	Adenin
Å	Ångström (10^{-10} m)	Ångström (10^{-10} m)
aRNAP	Archaeal RNA polymerase	Archeální RNA polymeráza
BH	Bridge helix	Mostový helix
bp	Base pair	Pár bází
bRNAP	Bacterial RNA polymerase	Bakteriální RNA polymeráza
C	Cytosine	Cytosin
DNA	Deoxyribonucleid acid	Deoxyribonukleová kyselina
EC	Elongation complex	Elongační komplex
ePEC	Elemental paused elongation complex	Elongační komplex pozastavený elementární pauzou
eRNAP	Eukaryotic RNA polymerase	Eukaryotická RNA polymeráza
G	Guanine	Guanin
kDa	Kilodalton ($1,66 \times 10^{-24}$ kg)	Kilodalton ($1,66 \times 10^{-24}$ kg)
LUCA	Last universal common ancestor	Poslední univerzální společný předek
mRNA	Messenger RNA	Mediátorová RNA
nt	Nucleotide	Nukleotid
NTP	Ribonucleoside triphosphate	Ribonukleosid trifosfát
NusA	N-utilization substance protein A	Protein A substance využívající N
PDB	Protein data bank	Proteinová data banka
RNA	Ribonucleid acid	Ribonukleová kyselina
RNAP	RNA polymerase	RNA polymeráza
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
SRP	Signal recognition particle	Částice rozpoznávající signál
ssRNA	Single strand RNA	Jednovláknová RNA
Sw	Switch domain	Přepínačová doména
t500	Terminátor pozdního genu fága $\phi 82$ <i>Bacillus subtilis</i>	
tDNA	Template DNA	Templátové vlákno DNA
t _{his}	Terminátor histidinového operonu <i>Salmonella typhimurium</i>	
T _{hp}	Termination hairpin	Terminační vlásenka
TL	Trigger loop	Spouštěcí smyčka
tRNA	Transfer RNA	Transferová RNA
U	Uracil	Uracil
UTR	Untranslated region	Nepřekládaná oblast
λ_{tR2}	Terminátor pravého operonu fága λ <i>Escherichia coli</i>	

Obsah

1 Úvod	1
2 Struktura RNA polymerázy, elongačního komplexu a jeho stabilita	2
2.1 Struktura RNA polymerázy a elongačního komplexu	2
2.2 Stabilita elongačního komplexu	3
2.3 Destabilizace elongačního komplexu související s terminací	4
3 Mechanismus vnitřní terminace transkripce.....	5
3.1 Signál pro vnitřní terminaci transkripce	5
3.2 Sekvenčně specifické pozastavení na U-oblasti	7
3.3 Skládání terminační vlásenky	10
3.4 Dokončení terminační vlásenky a její vliv na elongační komplex	11
3.4.1 Hypertranslokace elongačního komplexu a stříhání DNA:RNA hybridní molekuly .	13
3.4.2 Alosterická inaktivace elongačního komplexu invazí vlásenky	14
3.5 Inaktivace elongačního komplexu.....	15
3.6 Disociace elongačního komplexu.....	17
3.7 Role konformačních změn RNA polymerázy	18
4 Vnitřní terminace transkripce u eukaryot a archea.....	19
4.1 Vnitřní terminace transkripce u eukaryot	19
4.2 Vnitřní terminace transkripce u archea	21
5 Závěr.....	23
Seznam použité literatury	25

1 Úvod

Pochopení terminace transkripce je dlouhodobým cílem mnohých studií, jelikož transkripce je jedním z hlavních kontrolních bodů regulace genové exprese. Avšak molekulární mechanismy terminace transkripce jsou v mnohých klíčových aspektech dosud neznámé.

Transkripce genů buněčných organismů je zajištěna molekulárním proteinovým komplexem, DNA dependentní RNA polymerázou. RNA polymerázy mají vysokou sekvenční podobnost mezi bakteriemi, eukaryoty i archea, což poukazuje na strukturní i funkční homologii a umožňuje využití bakteriální RNA polymerázy jako modelu (ARCHAMBAULT a FRIESEN 1993).

Elongační komplex RNA polymerázy je velmi stabilní komplex, který umožňuje rychlý pohyb po DNA během elongace. Jednotlivé kroky terminace transkripce zajišťují rozložení tohoto komplexu a uvolnění nukleových kyselin. Přesnost terminace transkripce zajišťuje správnou expresi genů, definuje 3' konec pro funkční RNA struktury (například u nekódující RNA) a recykluje RNA polymerázu pro její rychlé opětovné využití.

Vnitřní terminace transkripce nevyžaduje žádné pomocné transkripční faktory, je závislá jenom na struktuře RNA polymerázy a sekvenci DNA a RNA. Sekvence zajišťující vnitřní terminaci transkripce se u bakterií vyskytují nejenom na konci operonů, kde zajišťují tvorbu 3' konce mRNA, ale například i uvnitř genů, mezi geny, nebo proti směru transkripce některých genů, kde se podílejí na regulaci genové exprese pomocí atenuace transkripce.

K pochopení mechanismu terminace transkripce je nutné se nejprve zamyslet nad stabilitou elongačního komplexu. Elongující RNA polymeráza je sice relativně stabilní, ale zároveň velmi dynamická struktura, která interaguje s kostrou nukleových kyselin. Vnitřní terminace transkripce nastává, když nascentní RNA v RNA kanálu RNA polymerázy vytvoří sekundární strukturu (terminující vlásenku, T_{hp}), která rozruší již nestabilní elongační komplex a způsobí jeho disociaci od nukleových kyselin.

Hlavním cílem této práce je popsat mechanismus vnitřní terminace transkripce u bakterií, která je zajištěna RNA polymerázou, strukturou DNA templátu a nascentní RNA. Dalším cílem je uvést příklady vnitřní terminace transkripce u eukaryot a archea a jejich porovnání s bakteriální vnitřní terminací transkripce. Pro lepší pochopení je v práci uveden i stručný přehled struktury RNA polymerázy a stability elongačního komplexu.

2 Struktura RNA polymerázy, elongačního komplexu a jeho stabilita

2.1 Struktura RNA polymerázy a elongačního komplexu

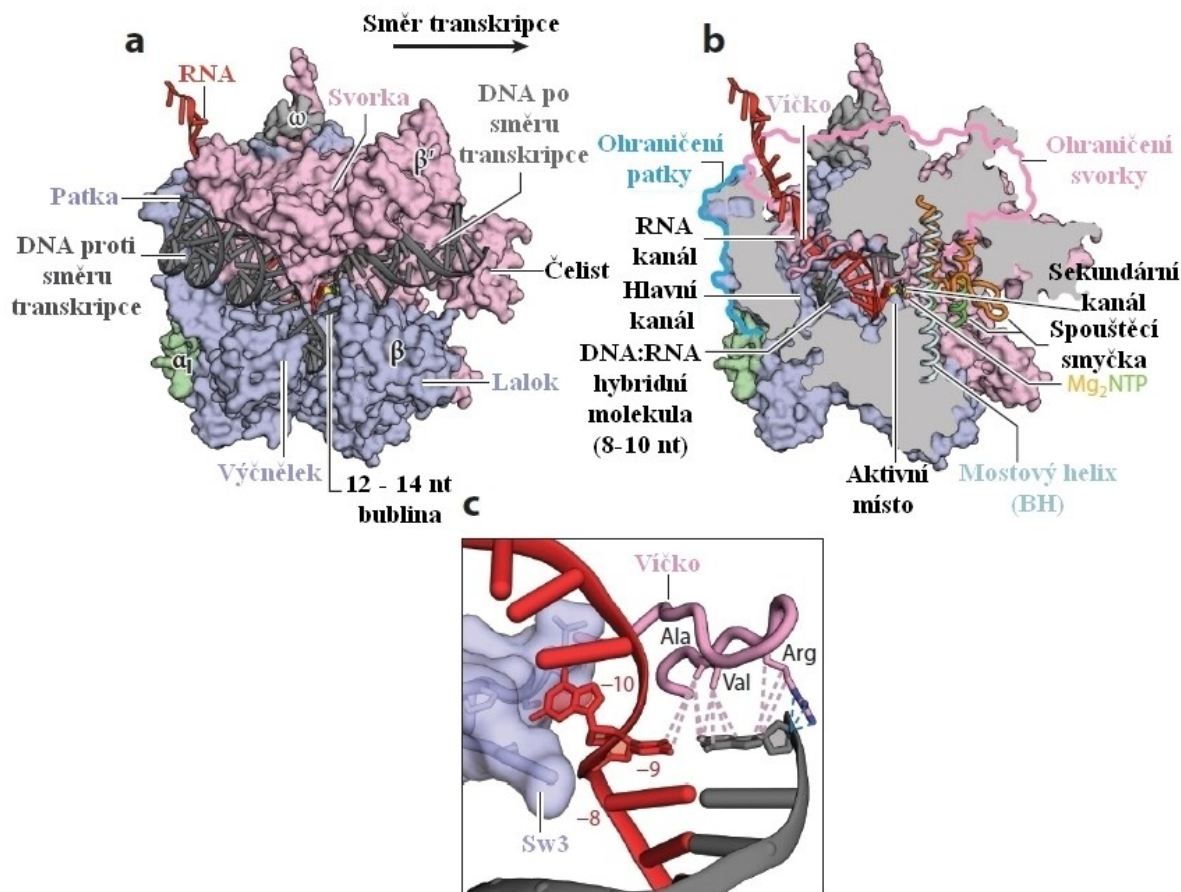
DNA dependentní RNA polymerázy (RNAP) jsou ve své nejčastější formě u gramnegativních bakterií složeny z 5 podjednotek s celkovou molekulovou hmotností přibližně 400 kDa (ZHANG *et al.* 1999). Eukaryotní komplexy RNAP obsahují 12 podjednotek s celkovou molekulovou hmotností přibližně 500 kDa (CRAMER *et al.* 2001). Katalytické centrum bakteriální RNAP (složené z $\alpha_2\beta\beta'\omega$ podjednotek) je evolučně zachováno v bakteriích, eukaryotech i archeích (ARCHAMBAULT a FRIESEN 1993; MINAKHIN *et al.* 2001).

Rentgenová struktura Taq RNAP (získaná z *Thermus aquaticus*) ukazuje molekulu RNAP ve tvaru „krabího klepeta“ s procházejícím, v průměru 27 Å širokým hlavním kanálem. Aktivní místo enzymu se vyskytuje na zadní stěně hlavního kanálu, kde je navázán nezbytný Mg^{2+} iont, potřebný pro katalýzu. Celý molekulární komplex RNAP se skládá z několika statických a pohyblivých domén, nazývaných například svorka, patka, víčko nebo lalok, které dohromady tvoří strukturu zavírajícího a otevírajícího se klepeta (Obrázek 1). Zavírání a otevírání klepeta zajišťují přepínačové domény 1-5 (Sw1-5), což jsou vysoce konzervované mobilní struktury RNAP (ZHANG *et al.* 1999; CRAMER *et al.* 2001; GNATT *et al.* 2001).

Elongační komplex (EC) pokrývá 12-14 nukleotidů (nt) transkripční bubliny, interaguje s 8-10 páry bází (bp) DNA:RNA hybridní molekuly, dále interaguje s 2-3 nt nascentní RNA a 9 bp DNA po směru transkripce (Obrázek 1) (NUDLER *et al.* 1997; KOMISSAROVA a KASHLEV 1998; SIDORENKOV *et al.* 1998; KORZHEVA *et al.* 2000).

Kromě hlavního kanálu se v RNAP vyskytuje RNA kanál, jímž odchází nascentní RNA, a sekundární (někdy nazývaný nukleotidový) kanál, skrz který se pravděpodobně dostávají jednotlivé ribonukleosid trifosfáty (NTP) k aktivnímu místu RNAP, protože se jedná o stericky nejpravděpodobnější cestu (ZHANG *et al.* 2015). Sekundární kanál je od hlavního kanálu oddělen mostovým helixem (BH) a spouštěcí smyčkou (TL). BH se může nacházet v rovné nebo zlomené konformaci a tato změna konformace tak může umožnit nebo zamezit přístup NTP k aktivnímu místu RNAP (ZHANG *et al.* 1999; CRAMER *et al.* 2001; GNATT *et al.* 2001). Změnu konformace BH vyvolává předešlá změna konformace TL a společné změny konformací BH a TL umožňují postupné přidávání jednotlivých nukleosid monofosfátů do rostoucího vlákna RNA během katalytického cyklu syntézy RNA (Obrázek 1b) (EPSHTEIN *et al.* 2002; BAR-NAHUM *et al.* 2005; WANG *et al.* 2006). RNA kanál je od hlavního kanálu oddělen víčkem, které u bakteriální RNA polymerázy (bRNAP) interaguje s 5' koncovým

nukleotidem RNA v DNA:RNA hybridní molekule a jeho komplementárním nukleotidem v DNA (pozice -9; počítáno od vazebného místa pro +1 NTP) (Obrázek 1). Víčko RNAP také interaguje s patkou (u eukaryotických RNAP označována jako zeď), což je flexibilní doména RNAP, která tvoří jednu stěnu RNA kanálu (VASSYLYEV *et al.* 2007).



Obrázek 1: Struktura elongačního komplexu. a) Model elongačního komplexu založený na struktuře EC *Thermus thermophilus* (PDB 2O5J). b) Pohled na řez elongačním komplexem. Jsou zobrazeny dvě konformace spouštěcí smyčky, zavřená zeleně (PDB 1IW7) a otevřená oranžově (PDB 2O5J). c) Rozhraní mezi RNA kanálem a hlavním kanálem EC (PDB 2O5I). Přerušované růžové čáry přibližně zobrazují *stacking* interakce, přerušované modré čáry zobrazují iontové interakce. Upraveno podle (RAY-SONI *et al.* 2016).

2.2 Stabilita elongačního komplexu

Elongační komplex s navázanými nukleovými kyselinami má, oproti volné RNAP, uzavřenější konformaci, s β a β' katalytickými podjednotkami, tvořícími jednotlivé ramena klepeta, blíže k sobě. Přiblížení β a β' podjednotek způsobí zúžení hlavního kanálu a tím pravděpodobně vede k ustanovení interakcí mezi enzymem a nukleovými kyselinami, což zvyšuje stabilitu EC (VASSYLYEV *et al.* 2007).

Cukr-fosfátová kostra nascentní RNA je v RNA kanálu v A-konformaci, která je běžná pro dvouvláknové RNA. Interakce RNA s RNA kanálem zajišťuje jenom pár vodíkových můstků, což naznačuje, že konformace RNA je udržována hlavně vlastními *stacking* interakcemi mezi bázemi a/nebo interakcemi RNA s prostředím (VASSYLYEV *et al.* 2007).

Cukr-fosfátová kostra DNA:RNA hybridní molekuly tvoří s hlavním kanálem RNAP četné polární a van der Waalsovy interakce. DNA po směru transkripce tvoří s RNAP jen několik málo polárních interakcí, což naznačuje, že její B-konformace je zajištěna vlastním párováním bází, zatímco orientace DNA v enzymu je stabilizována elektrostatickými a van der Waalsovými silami (VASSYLYEV *et al.* 2007).

Porovnáním první struktury EC RNA polymerázy II *Saccharomyces cerevisiae* a volné RNAP se dokázalo, že interakce EC s nukleovými kyselinami se ustanovují uzavřením svorky RNAP, jejíž pohyb je umožněn pěti přepínačovými doménami (GNATT *et al.* 2001). Ve struktuře EC Sw1 interaguje s templátovým vláknem DNA, Sw2 interaguje s koncem DNA:RNA hybridní molekuly po směru transkripce, Sw3 tvoří hydrofobní kapsu pro první nukleotid ssRNA, dislokovaný z DNA:RNA hybridní molekuly (Obrázek 1c), Sw4 a Sw5 se nepodílí na interakcích s nukleovými kyselinami (GNATT *et al.* 2001; VASSYLYEV *et al.* 2007). Víčko RNAP je částečně evolučně konzervované, a u bRNAP stabilizuje DNA:RNA hybridní molekulu *stacking* interakcemi s posledním párem bází DNA:RNA hybridní molekuly proti směru transkripce (VASSYLYEV *et al.* 2007; LANE a DARST 2010). U eukaryotické RNA polymerázy II víčko interaguje s poslední bází DNA DNA:RNA hybridní molekuly proti směru transkripce (WESTOVER *et al.* 2004). Víčko RNAP pravděpodobně napomáhá rozpletení DNA:RNA hybridní molekuly, čímž udržuje její stálou délku (GNATT *et al.* 2001; VASSYLYEV *et al.* 2007).

Interakce RNAP s nukleovými kyselinami jsou zodpovědné za stabilitu elongačního komplexu i při vysokých teplotách a vysoké iontové síle (WILSON a VON HIPPEL 1994; NUDLER *et al.* 1996).

2.3 Destabilizace elongačního komplexu související s terminací

Terminace transkripce může nastat v momentě, kdy se interakce RNAP s nukleovými kyselinami zeslabí natolik, že se vytvoří nestabilní elongační komplex, který se však za určitých okolností může znovu stabilizovat a pokračovat v elongaci. Prává terminace transkripce však vyžaduje disociaci EC od nukleových kyselin. K terminaci transkripce dochází jen tehdy, když jsou terminačními kroky zahájeny dříve, než dojde k translokaci

DNA a přidání dalšího ribonukleosid monofosfátu do nascentní RNA (Obrázek 2A, krok 1 nebo elongace). Na jakékoliv pozici templátové DNA je rozhodováno, zda dojde k prodloužení nascentní RNA o jeden ribonukleosid monofosfát nebo zda se zahájí terminační mechanismus. Elongační komplex je na většině míst templátové DNA stabilní, ale terminační sekvence způsobují jeho destabilizaci. Oblasti způsobující vnitřní terminaci transkripce zastavují elongaci a zahajují terminační mechanismus jenom na základně sekvence nukleových kyselin, avšak proteinové faktory, ovlivňující například rychlost elongace, mohou pozitivně či negativně ovlivnit efektivitu vnitřní terminace transkripce (VON HIPPEL a YAGER 1992).

Zastavení elongace způsobené sekvencí templátové DNA může trvat až několik minut a umožňuje elongačnímu komplexu začít s terminačními kroky na požadovaném místě templátové DNA (FARNHAM a PLATT 1981; LEE *et al.* 1990), jelikož poskytuje dostatek času pro sestavení sekundární struktury nascentní RNA, která způsobuje vnitřní terminaci transkripce. Proto je sekvenčně specifické pozastavení EC prvním krokem v mechanismu vnitřní terminace transkripce (Obrázek 2A, krok 1) (GUSAROV a NUDLER 1999).

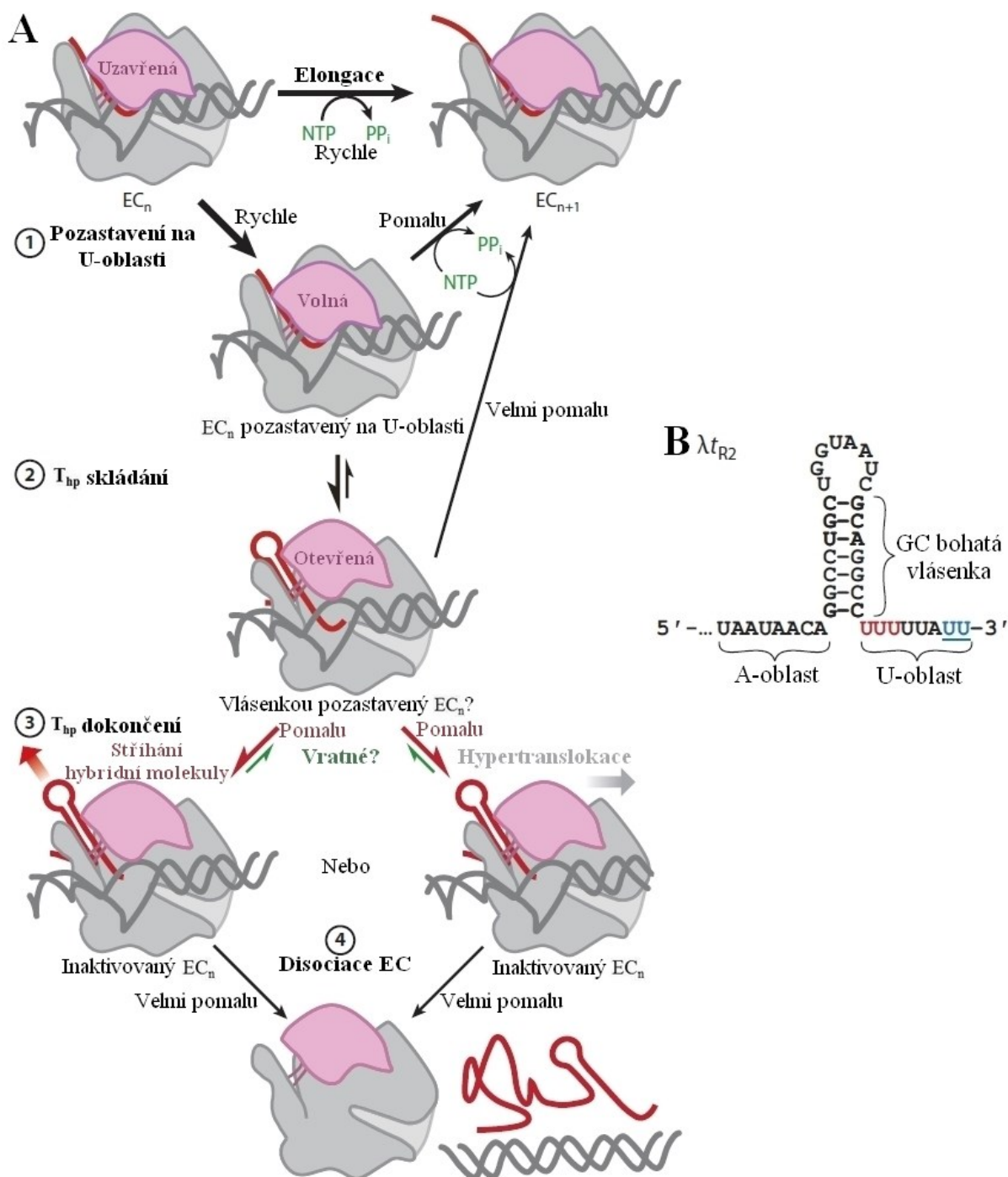
3 Mechanismus vnitřní terminace transkripce

Poté, co RNAP přepíše genetickou informaci, vnitřní terminace transkripce způsobí v několika krocích ukončení elongace na definovaném místě a uvolnění EC od nukleových kyselin. Po rozpoznání terminačního signálu elongačním komplexem dochází k následujícím událostem:

1. sekvenčně specifické pozastavení elongačního komplexu na U-oblasti
2. skládání terminační RNA vlásenky (T_{hp})
3. dokončení T_{hp} a pravděpodobná inaktivace elongačního komplexu
4. disociace elongačního komplexu

3.1 Signál pro vnitřní terminaci transkripce

Signál pro vnitřní terminaci transkripce je charakteristický GC bohatou oblastí následovanou několika A v templátovém vlákne DNA po směru transkripce. Tato sekvence po přepsání do RNA tvoří GC bohatou vlásenku a U-oblast dlouhou 7-8 nt (Obrázek 2B), lokalizovanou během počátku terminace transkripce v DNA:RNA hybridní molekule. První tři U, přepsané do molekuly RNA, jsou nejlépe evolučně zachovány v terminátorech bakterie *Escherichia coli* (Obrázek 5) (ROSENBERG a COURT 1979; D'AUBENTON CARAFA *et al.* 1990).



Obrázek 2: A) Schéma průběhu vnitřní terminace transkripce. Schematický model EC se svorkou a víčkem zobrazenými růžově, sekundárním kanálem zobrazeným světle šedě, RNA zobrazenou červeně a DNA zobrazenou tmavě šedě. Jsou zobrazeny dvě možné cesty dokončení T_{hp} a inaktivace EC. Zelené šipky značí možnou reaktivaci EC *in vivo*, červené šipky značí předpokládanou inaktivaci EC nevratnou *in vitro*. EC_n a EC_{n+1} značí délku transkriptu. B) Modelový terminátor pro vnitřní terminaci transkripce odvozený z fága λ . Červené U značí nejlépe evolučně konzervovanou část U-oblasti. Modré podtržené U značí místo terminace transkripce. Upraveno podle (RAY-SONI *et al.* 2016).

Vlastnosti terminační vlásenky nejsou mezi bakteriemi evolučně konzervovány. Stonek terminační vlásenky u *Bacillus subtilis* je u většiny terminačních sekvencí 9 ± 2 párů bází dlouhý, se smyčkou dlouhou 4 ± 1 nt u 70 % analyzovaných terminačních sekvencí. Kdežto pro *Escherichia coli* je běžnější terminační vlásenka s 7 ± 2 páry bází a smyčkou 4 ± 1 nt dlouhou u 85 % analyzovaných terminačních sekvencí. *Escherichia coli* má v porovnání s *Bacillus subtilis* tedy kratší stonek terminační vlásenky, ale vyšší zastoupení GC párů ve vlásence (78,2 % u *Escherichia coli*, 62,4 % u *Bacillus subtilis*). Celková Gibbsova volná energie vztažená na délku celé terminační vlásenky ukazuje, že terminační vlásenka u *Escherichia coli* je stabilnější (DE HOON *et al.* 2005).

Sekvenční a strukturní diverzita terminátorů napříč bakteriálními kmeny není dosud dostatečně prostudovaná. Na základě analýzy volné energie sekundárních struktur mRNA v okolí stop kodonů, která výrazně klesá v případě sestavování RNA vlásenky, bylo zjištěno, že u některých bakteriálních druhů na konci operonů zřejmě nedochází k sestavování terminační vlásenky a tedy využití vnitřní terminace transkripce. Proto bylo navrhováno, že vnitřní terminace transkripce zřejmě není obecným mechanismem u bakterií (WASHIO *et al.* 1998). Avšak nové bioinformatické postupy identifikovaly předpokládané terminační vlásenky rozdílných délek a tvarů (někdy bez U-oblasti) v sekvenovaných genomech většiny bakteriálních druhů (MITRA *et al.* 2009).

Další součástí terminačního signálu může být i A-oblast, jež se může vyskytovat v RNA proti směru transkripce vůči GC-oblasti v její bezprostřední blízkosti (Obrázek 2B). Donedávna se tato A-oblast nepovažovala za faktor ovlivňující efektivitu terminace transkripce, spíše jako znak určující oboustrannost terminačního signálu (WILSON a VON HIPPEL 1995). Dnes však existují experimentální důkazy prokazující, že A-oblast může efektivitu terminace transkripce pozitivně ovlivnit (viz kapitola 3.5) (CHEN *et al.* 2013).

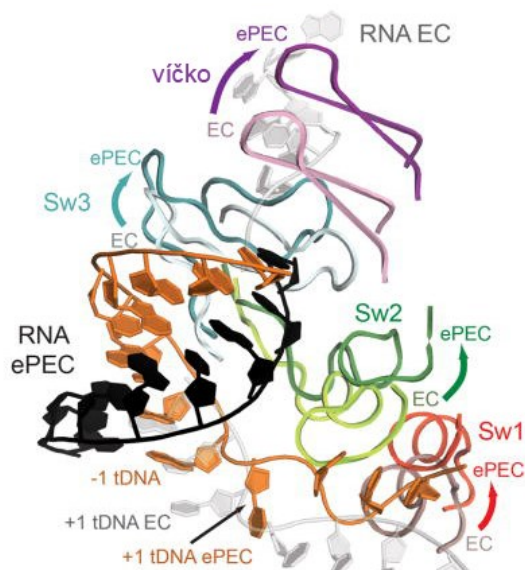
Terminační vlásenka a následující U-oblast jsou opakovaným vzorem ve všech kanonických bakteriálních signálech pro vnitřní terminaci transkripce, avšak vyskytují se obměny v přesné sekvenci a struktuře, které způsobují změny v efektivitě a mechanismu terminace (LARSON *et al.* 2008).

V určitých případech může na vnitřní terminaci transkripce mít vliv i DNA sekvence po i proti směru transkripce (viz kapitola 4).

3.2 Sekvenčně specifické pozastavení na U-oblasti

Proces transkripce probíhá přerušovaně, období rychlého přidávání nukleotidů do vlákna RNA je přerušováno častým pozastavením EC. Pravděpodobnost pozastavení EC

Konformační změny, které doprovází pozastavení EC, způsobují rozšíření hlavního kanálu i RNA kanálu RNAP odsunutím přepínačových domén od nukleových kyselin a tím přerušení interakcí EC s DNA:RNA hybridní molekulou a DNA po směru transkripce (Obrázek 3). Interakce s nascentní RNA však zůstávají zachovány a dochází i k vytvoření nových interakcí (WEIXLBAUMER *et al.* 2013). BH se v pozastaveném EC nachází ve zlomené konformaci, která stericky brání přístupu báze +1 nukleotidu templátové DNA do aktivního místa enzymu a o něco méně brání také přístupu substrátu k aktivnímu místu enzymu, který ovšem nemůže párovat s nedostupnou +1 bází templátové DNA (Obrázek 3) (WEIXLBAUMER *et al.* 2013). Svorková doména RNAP však není v kompletně otevřené konformaci, což naznačuje, že sekvence způsobující elementární pauzu zeslabují interakce nukleových kyselin se svorkou RNAP způsobem navozujícím její přechodný, povolený stav (WEIXLBAUMER *et al.* 2013; SEKINE *et al.* 2015).



8

Délka elementární pauzy může být prodloužena dvěma způsoby:

A) složením RNA vlásenky - takzvaná vlásenkou stabilizovaná pauza

Pokud dojde k pozastavení EC 11 nebo 12 nukleotidů od 3' konce RNA sekvence, jejíž sekundární struktura tvoří takzvanou zastavující vlásenku, dojde ke skládání RNA vlásenky v RNA kanálu a tím ke stabilizaci zastaveného EC. Zastavující vlásenka interaguje s patkovou doménou RNAP a znemožňuje uzavření svorky (TOULOKHONOV a LANDICK 2003; HEIN *et al.* 2014).

B) zpětnou translokací EC - takzvaná ustupující pauza

Během zpětné translokace dochází k posouvání nukleových kyselin uvnitř RNAP a ke znemožnění polymerázové aktivity RNAP odsunutím 3' konce RNA z aktivního místa enzymu do sekundárního kanálu. EC ve stavu ustupující pauzy se může k elongaci navrátit posunutím 3' konce RNA zpět do aktivního místa enzymu, nebo pomocí vnitřní nebo stimulované štěpící aktivity RNAP, kdy dochází k vytvoření nového 3' konce RNA v aktivním místě enzymu. Ustupující pauza je běžná například při opravném čtení po začlenění nesprávného nukleotidu do rostoucího řetězce RNA nebo při postavení EC na DNA:RNA hybridní molekule se slabým párováním bází, kdy se EC tímto zpětným posunutím dostane do pozice, kde je párování bází DNA:RNA hybridní molekuly silnější (KOMISSAROVA a KASHLEV 1997).

Vnitřní terminátory tvoří v nascentní RNA sekundární strukturu podobnou zastavující vlásence, která způsobuje rozrušení některých interakcí mezi nukleovými kyselinami a EC a tím způsobuje destabilizaci EC, ale zatím není jasné, zda T_{hp} dokáže prodloužit a stabilizovat pozastavení EC. Zpětná translokace pravděpodobně nemůže být prvkem v samotném mechanismu vnitřní terminace transkripce. Zpětná translokace o dva a více nukleotidů by znemožnila skládání T_{hp} . Záměna posledních dvou U po směru transkripce v U-oblasti (terminační místa) za G by měla výrazně potlačit zpětnou translokaci, ale na takto mutovaných terminátorech nedochází k pozastavení EC a terminaci (GUSAROV a NUDLER 1999). Nedá se tak vyloučit, že zpětná translokace o jeden nukleotid může mít roli v pozastavení na U-oblasti (GUSAROV a NUDLER 1999). Pokud by během terminace transkripce docházelo ke zpětné translokaci a tím odstranění 3' konce RNA z aktivního místa enzymu, došlo by k přerušení interakcí mezi β' podjednotkou RNAP a 3' koncem RNA, ale při použití zesílení mezi β' podjednotkou RNAP a 3' koncem RNA nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi uvězněným EC (forma nevratně inaktivovaného a velmi nestabilního EC)

a aktivním EC, což naznačuje, že i v uvězněném EC je 3' konec RNA přítomen v aktivním místě enzymu (GUSAROV a NUDLER 1999).

Sekundární struktury nascentní RNA, anebo komplementární oligonukleotidy navázané na RNA proti směru transkripce zpětné translokaci zabráňují. Proto se předpokládá, že jedna z funkcí T_{hp} během vnitřní terminace transkripce je znemožnění zpětné translokace a tím udržení EC na DNA:RNA hybridní molekule se slabým párováním bází, což by mělo usnadnit disociaci EC od nukleových kyselin (GUSAROV a NUDLER 1999; KOMISSAROVA *et al.* 2002).

Sekvence celé U-oblasti není nezbytně nutná pro složení T_{hp} , protože i v případě záměny U7-U9 v U-oblasti, je za podmínek umělého zastavení EC na konci T_{hp} syntéza RNA efektivně terminována *in vitro* (GUSAROV a NUDLER 1999). Avšak pokud se při použití mutovaných terminátorů EC uměle nezastaví, k terminaci transkripce nedochází. To naznačuje, že část U-oblasti po směru transkripce (U7-U9) je důležitá pro pozastavení EC a poskytnutí dostatku času pro skládání T_{hp} (Obrázek 2A, krok 1 a 2), kdežto část U-oblasti proti směru transkripce (U1-U5) je důležitá pro samotný proces skládání T_{hp} (více níže) (GUSAROV a NUDLER 1999).

3.3 Skládání terminační vlásenky

Nejoptimálnější terminační vlásenka, vzhledem k efektivitě terminace má 8-9 bp dlouhý stonek a smyčku obsahující 4-8 nt (WILSON a VON HIPPEL 1995). Skládání T_{hp} začíná uzavřením smyčky jedním nebo více nukleotidovými páry. Tento první krok může trvat jenom mikrosekundy, ale přesná doba se liší podle konkrétní sekvence tvořící vlásenku (WILSON a VON HIPPEL 1995; WOODSIDE *et al.* 2006).

Terminační vlásenka dlouhá 7 bp se začne sestavovat až po inkorporaci 7 nt po směru transkripce od 3' konce T_{hp} , což se dá vysvětlit stabilně udržovanou délkou DNA:RNA hybridní molekuly v EC, a dokončovat až po inkorporaci osmého nukleotidu po směru transkripce od 3' konce sekvence T_{hp} (Obrázek 2A, krok 2) (LUBKOWSKA *et al.* 2011). T_{hp} se stonkem delším než 7 párů bází se může začít skládat ještě dříve, než dojde k inkorporaci 7 nt po směru transkripce od 3' konce T_{hp} , což by znamenalo možnou postradatelnost pozastavení EC na U-oblasti pro skládání T_{hp} (PENNO *et al.* 2015).

Jakmile začne skládání T_{hp} , podporované interakcí T_{hp} s patkou bRNAP, dojde k rychlému prodloužení stonku RNA vlásenky až na poslední 1-2 nt, kde se vyskytuje energetická bariéra tvořená RNAP a DNA:RNA hybridní molekulou (EPSHTEIN *et al.* 2007; LUBKOWSKA *et al.* 2011).

Zda T_{hp} způsobuje pozastavení stabilizované vlásenkou, není jasné, avšak skládání T_{hp} vyúsťuje ve strukturu podobnou zastavovací vlásence a pravděpodobně tedy podporuje zastavení EC tak, aby byl poskytnut dostatek času pro dokončení T_{hp} a účinnou disociaci EC (EPSHTEIN *et al.* 2007; LUBKOWSKA *et al.* 2011).

Sekvence nascentní RNA proti směru transkripce vůči T_{hp} , která je komplementární k ramenu stonku T_{hp} proti směru transkripce, může negativně ovlivnit efektivitu terminace transkripce zamaskováním tohoto ramene před párování s ramenem stonku T_{hp} po směru transkripce. Tím je skládání T_{hp} znemožněno (LUBKOWSKA *et al.* 2011).

3.4 Dokončení terminační vlásenky a její vliv na elongační komplex

Dokončení posledních 2-3 bp T_{hp} je stericky zabráněno okrajem RNAP a DNA:RNA hybridní molekulou, proto dokončení T_{hp} vyžaduje uvolnění -10 nukleotidu RNA od Sw3 domény a přerušení *stacking* interakcí mezi víčkem RNAP a koncovými nukleotidy DNA:RNA hybridní molekuly proti směru transkripce (pozice -9) (Obrázek 1c) (VASSYLYEV *et al.* 2007).

V souladu s touto skutečností bylo zjištěno, že skládání T_{hp} na terminátoru λt_{R2} začíná po přepsání 7 nt po směru transkripce od stonku T_{hp} , ale stonek T_{hp} zůstává na této pozici EC nedokončený. Je předpokládáno, že po přepsání osmého nukleotidu po směru transkripce od stonku T_{hp} dochází ke strukturním změnám EC, které umožní dokončení stonku T_{hp} . Tyto pozice jsou pro terminátor λt_{R2} terminačními místy. Oddělení skládání větší části T_{hp} a dokončení posledních 2-3 párů bází stonku T_{hp} může být způsobeno nutností překonat energetickou bariéru tvořenou RNAP a DNA:RNA hybridní molekulou (LUBKOWSKA *et al.* 2011).

K vnitřní terminaci transkripce a tedy ke složení a dokončení T_{hp} může docházet i na pozici U7, tedy po přepsání 7 nukleotidů po směru transkripce od stonku T_{hp} , bez přepsání osmého nukleotidu po směru transkripce od stonku T_{hp} (GUSAROV a NUDLER 1999). Skládání a dokončení T_{hp} na stejné pozici EC vzhledem k templátu se ale vylučuje s modelem dvoukrokového skládání T_{hp} na terminátoru λt_{R2} (LUBKOWSKA *et al.* 2011). Je předpokládáno, že dopředné posunutí EC o jeden nukleotid po již zahájeném skládání T_{hp} u modelu pro λt_{R2} je artefakt vzniklý použitou metodou, jelikož v dané situaci byla zvýšená energetická náročnost pro rozplétání DNA:RNA hybridní molekuly ze strany proti směru transkripce díky použití stabilizované DNA:RNA hybridní molekuly (RAY-SONI *et al.* 2016). Tudíž bylo znemožněno dokončení T_{hp} na daném místě EC a arteficiálně upřednostněno posunutí EC o jeden nukleotid. Avšak dvoukrokové sestavení T_{hp} je, nezávisle na struktuře

terminátoru, pravděpodobně vždy nutné, díky energetické bariéře tvořené interakcemi víčka RNAP a Sw3 domény RNAP s nukleovými kyselinami (RAY-SONI *et al.* 2016).

Dokončení T_{hp} vede k přerušení interakcí mezi RNA a RNA kanálem a k rozpletení až 4 bp DNA:RNA hybridní molekuly proti směru transkripce, což přispívá k destabilizaci EC a vysvětluje vysokou evoluční konzervovanost prvních tří U v U-oblasti vnitřního terminátoru (GUSAROV a NUDLER 1999; KOMISSAROVA *et al.* 2002).

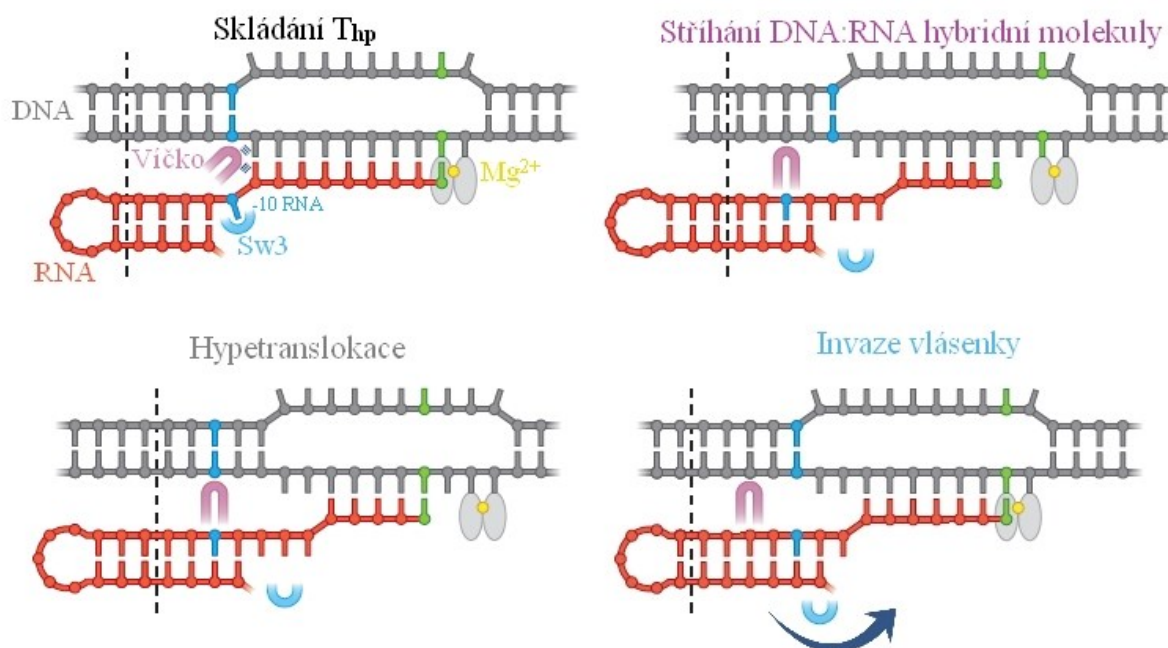
Mutace U v U1-U5 U-oblasti za G způsobující silnější párování bází DNA:RNA hybridní molekuly zabraňují skládání T_{hp} , zatímco mutace vedoucí k oslabení párování bází DNA:RNA hybridní molekuly v U-oblasti vedou k opačnému efektu (GUSAROV a NUDLER 1999). Pozice templátové DNA, na které může dojít k dokončení T_{hp} , je tedy dána rozdílem energetické síly posledních 2-3 bp stonku T_{hp} oproti prvním 3-4 bp DNA:RNA hybridní molekuly proti směru transkripce a zdali energetická ztráta při rozrušení párování těchto 3-4 bp DNA:RNA hybridní molekuly a interakcí mezi víčkem RNAP a DNA:RNA hybridní molekulou a Sw3 doménou a RNA je menší než energetický zisk, který je získán dokončením párování bází spodní části stonku T_{hp} (RAY-SONI *et al.* 2016).

Jsou navrhovány tři modely, vysvětlující jakým způsobem dokončená T_{hp} ovlivňuje EC (Obrázek 2A, krok 3; Obrázek 4):

A) Hypertranslokace elongačního komplexu o 2-4 bp po směru transkripce vůči místu terminace bez přidávání nukleosid monofosfátů do vlákna RNA (YARNELL a ROBERTS 1999; SANTANGELO a ROBERTS 2004)

B) Stříhání DNA:RNA hybridní molekuly klouzáním RNA v DNA:RNA hybridní molekulě proti směru transkripce bez translokace EC (KOMISSAROVA *et al.* 2002)

C) Invaze vlásenky do hlavního kanálu RNAP a alosterická inaktivace elongačního komplexu (EPSHTEIN *et al.* 2007)



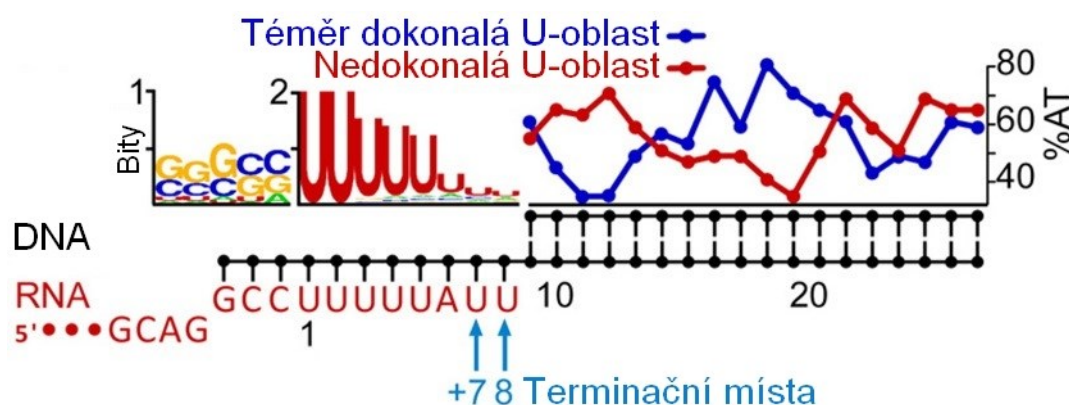
Obrázek 4: Zobrazení nukleových kyselin v EC při sestavení T_{hp} , po hypertranslokaci, po stříhání DNA:RNA hybridní molekuly a po alosterické inaktivaci. Nukleotidy jsou zobrazeny jako kolečka s čárami. Aktivní místo enzymu je zobrazeno jako dva šedé ovály, špička víčka jako růžový oblouk a Sw3 doména jako modrý polokruh. *Stacking* interakce mezi víčkem a DNA:RNA hybridní molekulou jsou zobrazeny jako modré čáry. Konec RNAP proti směru transkripce vůči RNA je zobrazen jako černá přerušovaná čára. Zelené nukleotidy značí pozici -1 nt, modré nukleotidy značí pozici -10 nt. Modrá šipka naznačuje směr invaze vlásenky. Upraveno podle (RAY-SONI *et al.* 2016).

3.4.1 Hypertranslokace elongačního komplexu a stříhání DNA:RNA hybridní molekuly

Byla zkoumána efektivita vnitřní terminace transkripce na jednotlivých molekulách RNAP *in vitro* u třech různých terminačních sekvencí (terminátory t_{his} , t_{500} a λ_{tR2}). Pomocí imobilizace templátové DNA a elongující RNAP bylo možné sledovat vliv pozitivní nebo negativní síly na translokaci RNAP. Vliv pozitivní nebo negativní síly na nascentní RNA byl sledován pomocí imobilizace zastavených EC a DNA s jednovláknovým komplementárním přesahem k nascentní RNA (LARSON *et al.* 2008).

Bylo zjištěno, že u t_{his} a λ_{tR2} terminátorů není ovlivněna efektivita vnitřní terminace transkripce při znemožnění translokace RNAP na terminační sekvenci, což znamená, že vnitřní terminace transkripce na těchto terminátorech není závislá na hypertranslokaci (LARSON *et al.* 2008). Avšak hypertranslokace je pravděpodobná u terminátoru t_{500} . Tento kontrast naznačuje, že hypertranslokace není obecným jevem v mechanismu vnitřní terminace transkripce (LARSON *et al.* 2008). Jsou možné i jiné mechanismy a jejich výskyt je závislý na U-oblasti konkrétního terminátoru. Terminátory t_{his} a λ_{tR2} mají U-oblast dokonalou

(obsahující jenom U) anebo přerušenu jen jedním A na pozici 6 (téměř dokonalá U-oblast). Slabé párování bází na těchto U-oblastech umožňuje posun RNA v DNA:RNA hybridní molekule a je tedy pravděpodobný mechanismus stříhání DNA:RNA hybridní molekuly. U-oblast terminátoru t500 je přerušena na dvou místech (nedokonalá U-oblast) a může tedy pro uvolnění nascentní RNA vyžadovat hypertranslokaci (LARSON *et al.* 2008). V souladu s tímto je i tvrzení, že terminátory s dokonalou U-oblastí jsou nezávislé na sekvenci DNA po směru transkripce, což naznačuje nepotřebnost rozplétání DNA po směru transkripce, ke kterému dochází při hypertranslokaci. To ale neplatí pro terminátory s četnými přerušeními v U-oblasti, které pravděpodobně vyžadují hypertranslokaci pro rozrušení párů bází silné DNA:RNA hybridní molekuly, protože jejich sekvence DNA po směru transkripce je v oblasti +10-12 (počítáno od začátku U-oblasti) bohatší na AT páry (Obrázek 5). Hypertranslokace se tedy pravděpodobně vyskytuje v případě, kdy je energeticky výhodnější než posun RNA v DNA:RNA hybridní molekule (LARSON *et al.* 2008).



Obrázek 5: Vlastnosti sekvence téměř dokonalé U-oblasti a nedokonalé U-oblasti. Nukleotidy zobrazeny jako kolečka s čárami. Evoluční konzervovanost U v U-oblasti je zpracována pomocí WebLogo (www.weblogo.berkeley.edu). Procentuální zastoupení AT v oblasti po směru transkripce je získáno z 50 téměř dokonalých U-oblastí (modře) a 50 nedokonalých U-oblastí (červeně). Upraveno podle (PETERS *et al.* 2011).

3.4.2 Alosterická inaktivace elongačního komplexu invazí vlásenky

Během hypertranslokace a stříhání DNA:RNA hybridní molekuly dochází k odstranění 3' konce RNA z aktivního místa enzymu, avšak studie podporující alosterickou inaktivaci EC invazí vlásenky dokazují, že v inaktivovaném EC před terminací 3' konec RNA v aktivním místě enzymu zůstává (EPSHTEIN *et al.* 2007).

Alosterická inaktivace je závislá na změně konformace pohyblivých domén RNAP, které způsobí rozšíření RNA kanálu a hlavního kanálu a umožní tím invazi T_{hp} . Některé z těchto pohyblivých domén, například patka RNAP, mohou podporovat skládání a stabilizaci T_{hp} , což bylo dokázáno mutacemi v RNA kanálu na místech, které jsou nejbližší smyčce

a horní části stonku T_{hp} . Tyto mutace způsobí znemožnění vnitřní terminace transkripce (EPSHTEIN *et al.* 2007).

Podle strukturních modelů začne T_{hp} vnikat do hlavního kanálu RNAP po dosažení délky 4-5 bp, během čehož dochází k rozpletení části DNA:RNA hybridní molekuly proti směru transkripce. Jakmile stonek T_{hp} dosahuje délky 7-8 bp, dostává se hlouběji do hlavního kanálu RNAP a smyčka s horní částí stonku T_{hp} interaguje s netemplátovým vláknem DNA a TL, které touto interakcí pravděpodobně vynucuje zavřenou konformaci a tím zamezuje katalytické funkci RNAP. Interakce T_{hp} s TL by mohla být vysvětlena i nahrazením dvouvláknové DNA po směru transkripce ve svorkové doméně stonkem T_{hp} , což je ale méně pravděpodobný model (EPSHTEIN *et al.* 2007).

Bodové mutace v TL ovlivňují míru zastavení EC na terminační sekvenci, což může souviset se znemožněním katalytické funkce RNAP způsobené invazí T_{hp} . Změna konformace TL by mohla vyvolat i změnu konformace jiných částí RNAP a tím způsobit otevření svorkové domény RNAP, což by přerušilo interakce mezi RNAP a nukleovými kyselinami a tím vedlo k disociaci RNAP od nukleových kyselin (EPSHTEIN *et al.* 2007).

Model alosterické inaktivace je podporován i vlivem specifických monoklonálních protilátek proti TL. Navázání protilátek proti TL na elongační komplex RNAP způsobí zastavení elongace a znemožní disociaci RNA, kdežto navázání protilátek proti TL na již zastavený EC na terminačním místě disociaci RNA neovlivní. Tato skutečnost ukazuje, že navázání protilátky proti TL v její otevřené konformaci stabilizuje TL a/nebo znemožní změnu konformace TL na zavřenou, kdežto pokud se TL vyskytuje v zavřené konformaci, vazebné místo pro protilátku není dostupné, možná díky inaktivaci EC terminační vlásenkou (EPSHTEIN *et al.* 2007).

3.5 Inaktivace elongačního komplexu

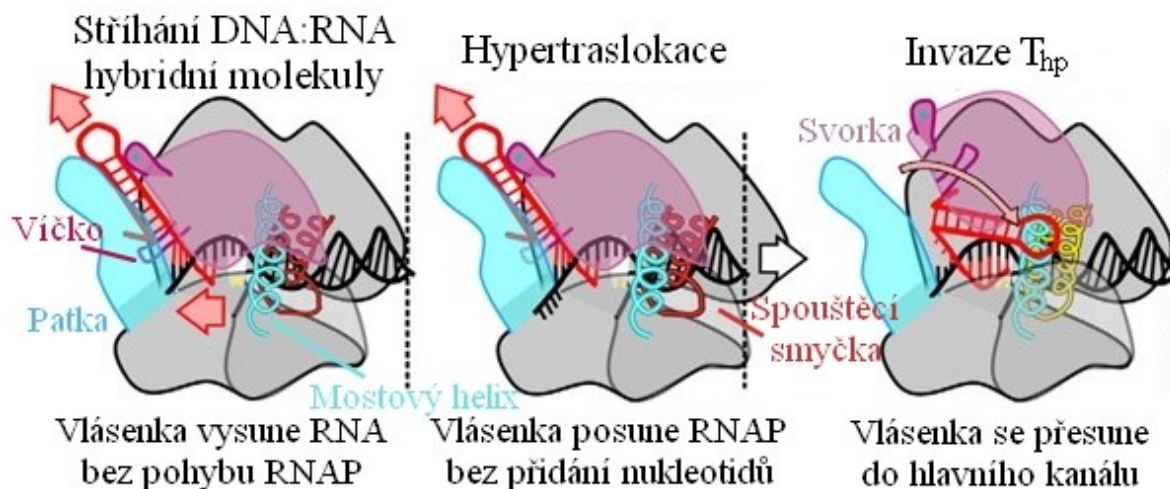
Je předpokládáno, že před disociací EC dochází k nevratné inaktivaci EC (YIN *et al.* 1999), což vylučuje vnímání efektivity vnitřní terminace transkripce jen jako kinetickou kompetici mezi elongací a disociací EC (VON HIPPEL a YAGER 1992). EC terminující na terminátoru t_{his} zůstává před disociací na terminační sekvenci pozastaven přibližně 64 s, to je delší čas, než na jaký se pozastaví EC, který se proče přečte přes terminační sekvenci a pokračuje v elongaci, což podporuje předpoklad vzniku nevratně inaktivovaného EC neschopného další elongace, který zůstává navázán na DNA:RNA hybridní molekule, dokud nedojde k disociaci EC od nukleových kyselin (YIN *et al.* 1999).

Je navrhováno několik modelů, vysvětlujících inaktivaci EC. Jeden z nich považuje dokončení T_{hp} za dostačující faktor pro inaktivaci EC, vzhledem k destabilizaci EC vzniklou rozpletením prvních několika nukleotidů DNA:RNA hybridní molekuly proti směru transkripce (GUSAROV a NUDLER 1999). K inaktivaci EC v tomto modelu by mohlo docházet invazí T_{hp} do hlavního kanálu za pomoci některých pohyblivých domén RNAP, což by způsobilo strukturní změny v aktivním místě enzymu, otevření svorkové domény RNAP a tím pádem alosterickou inhibici syntézy RNA bez nutnosti posunu 3' konce RNA z aktivního místa enzymu (EPSHTEIN *et al.* 2007). Bylo ale dokázáno, že v podmínkách se sníženou iontovou silou, EC *Escherichia coli* po přepsání terminátoru λt_{R2} disociuje ale dochází ke zpětnému navázání nukleových kyselin na RNAP a tím vznikají komplexy RNAP:DNA a RNAP:RNA. Studie podporující model inaktivace EC popsany výše využívaly podmínky se sníženou iontovou silou ke stabilizaci nestabilního terminačního komplexu, což mohlo vést k nepřesným interpretacím (KASHLEV a KOMISSAROVA 2002). Druhý model vysvětluje inaktivaci EC odstraněním 3' konce RNA z aktivního místa enzymu a zkrácením délky DNA:RNA hybridní molekuly, čehož se dá dosáhnout hypertranslokací a střiháním DNA:RNA hybridní molekuly (Obrázek 6) (LARSON *et al.* 2008).

Faktory ovlivňující efektivitu vnitřní terminace transkripce by po inaktivaci EC neměly mít žádný vliv a musí se tedy projevit před předpokládanou nevratnou inaktivací EC. Silné terminátory mají kromě U-oblasti i A-oblast, vyskytující se proti směru transkripce vůči T_{hp} , která, pokud je v dostatečné blízkosti k T_{hp} , zvyšuje efektivitu vnitřní terminace transkripce (CHEN *et al.* 2013). Zvýšení efektivitu vnitřní terminace transkripce je vysvětlováno párováním A-oblasti s U-oblastí, které by způsobilo prodloužení stonku T_{hp} a kompletní rozrušení DNA:RNA hybridní molekuly. K párování A-oblasti s U-oblastí by tedy mohlo dojít až po dokončení T_{hp} , ale před předpokládanou inaktivací EC. Toto naznačuje, že dokončení T_{hp} je vratný proces a párování A-oblasti s U-oblastí urychluje terminační mechanismus a disociaci nukleových kyselin od EC, což by zabránilo pozastavenému EC v navracení k elongaci (CHEN *et al.* 2013).

Při pokusech prováděných *in vitro* nebylo pozorováno ovlivnění efektivitu vnitřní terminace transkripce přítomností A-oblasti před T_{hp} , což může být vysvětlováno malou mírou reaktivace EC po dokončení skládání T_{hp} při použití purifikovaných EC v podmínkách *in vitro* (WILSON a VON HIPPEL 1995; RAY-SONI *et al.* 2016). Buněčné elongační faktory jako například NusA, by se mohly podílet na reaktivaci pozastaveného EC (WILSON a VON HIPPEL

1995), čímž by A-oblast ovlivňovala předpokládanou kompetici mezi disociací a reaktivací EC *in vivo* urychlením disociace (RAY-SONI *et al.* 2016).



Obrázek 6: Způsoby inaktivace EC. DNA zobrazena černě, RNA zobrazena červeně, svorková doména s víčkem zobrazeny růžově, patková doména zobrazena modře. Spouštěcí smyčka naznačena ve dvou konformacích, v otevřené konformaci tmavě červeně, v zavřené konformaci žlutě. Červené šipky naznačují směr pohybu RNA, bílé šipky naznačují směr pohybu RNAP. Upraveno podle (PETERS *et al.* 2011).

3.6 Disociace elongačního komplexu

Přítomnost U-oblasti se slabým párováním bází v DNA:RNA hybridní molekule, dokončení skládání T_{hp} a s tím související rozpletení prvních několika párů bází DNA:RNA hybridní molekuly proti směru transkripce, destabilizuje EC a umožňuje poslední krok vnitřní terminace transkripce, disociaci RNAP od nukleových kyselin (Obrázek 2A, krok 4) (MARTIN a TINOCO 1980; GUSAROV a NUDLER 1999; KOMISSAROVA *et al.* 2002).

Využitím purifikovaných RNAP a syntetizovaných DNA a RNA oligonukleotidů bylo umožněno sledovat efektivitu terminace transkripce při různé délce DNA:RNA hybridní molekuly. Bylo dokázáno, že EC s DNA:RNA hybridní molekulou dlouhou 5 bp, což je délka, která zůstává po dokončení T_{hp} , potřebuje téměř stejnou dobu pro uvolnění nukleových kyselin jako EC se složenou T_{hp} (KOMISSAROVA *et al.* 2002). Dokončení T_{hp} doprovází přerušení interakcí mezi RNAP a nukleovými kyselinami, konkrétně *stacking* interakcí mezi víčkem RNAP a koncovým párem bází nukleotidů DNA:RNA hybridní molekuly proti směru transkripce a uvolnění báze -10 RNA od Sw3 domény (popsáno výše). Dochází pravděpodobně i k přerušení interakcí mezi RNA molekulou a RNA kanálem EC, avšak není známo, zda během hypertranslokace nebo stříhání DNA:RNA hybridní molekuly dochází

k obnovení těchto vazeb vzhledem k tomu, že během těchto dějů dochází k posunu RNA uvnitř RNAP (RAY-SONI *et al.* 2016).

Pozastavený EC se vyskytuje v povoleném stavu, s rozšířeným hlavním kanálem a RNA kanálem, odsunutými přepínačovými doménami a tím oslabenými interakcemi s DNA:RNA hybridní molekulou a DNA po směru transkripce, což možná přispívá k disociaci inaktivovaných EC (WEIXLBAUMER *et al.* 2013).

Přesné konformační změny RNAP předcházející disociaci EC zůstávají zatím neznámé. Dosud není známo ani pořadí, ve kterém se uvolňují DNA a RNA molekuly, a zda je toto pořadí přesně dáno nebo ovlivněno konkrétní terminační sekvencí (RAY-SONI *et al.* 2016).

3.7 Role konformačních změn RNA polymerázy

Vliv konformačních změn RNAP na jednotlivé kroky terminace transkripce není doposud dopodrobna prostudován.

Ze struktury RNAP vyplývá, že dokončená T_{hp} by neměla být neslučitelná se standartní délkou DNA:RNA hybridní molekuly v EC. Avšak při dokončení T_{hp} je prvních několik párů bází DNA:RNA hybridní molekuly proti směru transkripce rozpleteno, což naznačuje, že některým možným konformacím nukleové kyseliny v EC je stericky zabráněno. Nekompatibilita dokončené T_{hp} se standartní délkou DNA:RNA hybridní molekuly v EC naznačuje, že rozplétání DNA:RNA hybridní molekuly doprovází konformační změny ve struktuře RNAP, které jsou zatím nejasné (RAY-SONI *et al.* 2016).

Dokončení T_{hp} se tedy zdá být prvním krokem, který rozlišuje pozastavený EC od EC schopného efektivní terminace transkripce, jelikož pravděpodobně vede ke změnám struktury v nukleových kyselinách i samotné RNAP, nezbytných pro terminaci transkripce. Tyto změny konformace mohou nevratně inaktivovat EC a zajistit vnitřní terminaci transkripce (RAY-SONI *et al.* 2016).

Je známo, že patka RNAP interaguje se složenou RNA vlásenkou a špička patky [specifická pro bRNAP (LANE a DARST 2010)] je nezbytná pro pauzu stabilizovanou vlásenkou (TOULOKHONOV a LANDICK 2003), ačkoliv samotnému skládání RNA vlásenky zřejmě částečně brání (HEIN *et al.* 2014). Konformační změny svorkové domény a víčka RNAP předcházejí disociaci EC, avšak bylo dokázáno, že víčko není nezbytné pro vnitřní terminaci transkripce, jelikož RNAP bez víčka je schopná efektivní vnitřní terminace transkripce *in vitro* (TOULOKHONOV *et al.* 2001; TOULOKHONOV a LANDICK 2006; SEKINE *et al.* 2015).

Před terminací dochází ke změně konformace RNAP, která oddálí přepínačové domény od nukleových kyselin, čímž dochází k přerušení interakcí mezi nimi, umožnění elementárního pozastavení EC, sestavení T_{hp} a snížení stability EC (GNATT *et al.* 2001; WEIXLBAUMER *et al.* 2013). Díky experimentům s mutacemi v přepínačových doménách Sw2, Sw3 a Sw5 bylo zjištěno, že přepínačové domény mají vliv na efektivitu vnitřní terminace transkripce (WEILBAECHER *et al.* 1994; CHEERAN *et al.* 2005).

V modelu vysvětlující inaktivaci EC invazí T_{hp} do hlavního kanálu je zapotřebí i změna konformace TL, přispívající k inaktivaci aktivního místa enzymu (EPSHTEIN *et al.* 2007). V pozastavených EC bylo pozorována ohnutá konformace BH, která může souviset s předpokládanou změnou konformace TL, která je v krystalu pozastaveného EC strukturně neuspořádaná (WEIXLBAUMER *et al.* 2013). Pozorované změny v konformaci BH v pozastavených EC podporují možnost inaktivace EC zamezením přístupu nukleotidů k aktivnímu místu enzymu (WEIXLBAUMER *et al.* 2013).

Změny v RNAP ovlivňující stabilitu EC a efektivitu vnitřní terminace transkripce jsou tedy známé, avšak přesný stav jednotlivých částí RNAP v terminačních komplexech zůstává zatím neznámý (RAY-SONI *et al.* 2016).

4 Vnitřní terminace transkripce u eukaryot a archea

Struktura katalytického centra RNA polymerázy a jeho funkce při elongaci transkripce je velmi podobná pro bakteriální RNAP (bRNAP), archeální RNAP (aRNAP) i pro eukaryotické RNAP I, II a III (eRNAP I-III). Avšak mechanismus terminace transkripce je u jednotlivých RNA polymeráz rozdílný. Je známo, že vnitřní terminace transkripce je využívána hlavně bakteriemi, avšak je dokázáno, že i aRNAP a eRNAP III využívají vnitřní terminaci transkripce a U-oblast DNA:RNA hybridní molekuly k pozastavení EC (COZZARELLI *et al.* 1983; SANTANGELO a REEVE 2006; NIELSEN *et al.* 2013).

4.1 Vnitřní terminace transkripce u eukaryot

Terminační signál pro terminaci transkripce EC eRNAP III tvoří u kvasinek obvykle 6-7 nt dlouhá U-oblast, na jejíž rozpoznání má vliv sekvence DNA po i proti směru transkripce (COZZARELLI *et al.* 1983; WATSON *et al.* 1984; BRAGLIA *et al.* 2005). Tomuto terminačnímu signálu nepředchází terminační vlásenka, ale k disociaci EC může být využíváno vlastních sekundárních struktur nascentní RNA, jelikož produkty eRNAP III jsou velmi bohaté na sekundární struktury (5S rRNA, SRP, tRNA a další). Avšak pro efektivní

terminaci transkripce je esenciální pozastavení EC eRNAP III na U-oblasti, která se nachází v DNA:RNA hybridní molekule. (NIELSEN *et al.* 2013).

Minimální vzdálenost sekundární struktury od terminačního místa pro EC eRNAP III je 7 nt, což se podobá bakteriálnímu mechanismu vnitřní terminace transkripce, ačkoliv EC eRNAP III je schopný pro disociaci využít i sekundárních struktur vzdálených až 20 nt od aktivního místa enzymu (NIELSEN *et al.* 2013). Bylo dokázáno, že EC eRNAP III je po pozastavení na U-oblasti schopný zpětné translokace do takové vzdálenosti, aby se přiblížil nejbližší sekundární struktuře RNA (NIELSEN *et al.* 2013). Eukaryotická RNAP III má za normálních okolností velmi efektivní vnitřní RNA endonukleázovou aktivitu, což naznačuje, že během zpětné translokace na dlouhou vzdálenost související s terminací transkripce musí být štěpící aktivita znemožněna (NIELSEN *et al.* 2013).

Vzhledem ke zpětné translokaci předcházející terminaci transkripce EC eRNAP III u některých transkriptů nelze počítat se slabým párováním bází v DNA:RNA hybridní molekule pro disociaci EC (NIELSEN *et al.* 2013). Bylo dokázáno, že EC eRNAP III je schopný disociovat i na G-oblasti v DNA:RNA hybridní molekule, což znamená, že EC eRNAP III k terminaci transkripce nutně nevyžaduje slabé párování bází v oblasti DNA:RNA hybridní molekuly (NIELSEN *et al.* 2013). Zpětná translokace vylučuje i přítomnost homopolymerní sekvence v DNA:RNA hybridní molekule, což vylučuje mechanismus stříhání DNA:RNA hybridní molekuly. Nejpravděpodobnějším mechanismem inaktivace EC se zdá alosterický model, avšak není vyloučeno, že mechanismus terminace transkripce EC eRNAP III probíhá jiným, dosud neznámým mechanismem (NIELSEN *et al.* 2013). Díky studiím využívajícím různě purifikované EC však dodnes není jistě potvrzená role sekundárních struktur RNA, předcházejících U-oblasti, v terminaci transkripce eRNAP III *in vivo* (ARIMBASSERI *et al.* 2014; NIELSEN a ZENKIN 2014).

Na rozeznání terminačního signálu U-oblasti eRNAP III se podílí i T-oblast netemplátového vlákna *in vitro*. Po přepsání prvních čtyř U do nascentního vlákna RNA se EC pozastaví a přejde do přechodného předterminačního stavu, který vyžaduje přítomnost T3-T4 nukleotidů v netemplátovém vlákně DNA a specifických podjednotek C53, C37 a C11 eRNAP III (ARIMBASSERI a MARAIA 2015). Po přepsání pátého U dojde k uvolnění transkriptu z EC, které je závislé na přítomnosti a předpokládané interakci T5 nukleotidu netemplátového vlákna DNA a C37 podjednotky eRNAP III (ARIMBASSERI a MARAIA 2015).

Za určitých podmínek jsou schopny i ostatní eRNAP vnitřní terminace transkripce. Bylo dokázáno, že i eRNAP II dokáže efektivně terminovat transkripci na modelovém

bakteriálním terminátoru $\lambda_{T_{R2}}$ způsobem závislým na terminační RNA vlásence *in vitro* (KOMISSAROVA *et al.* 2002). Sekvenčně specifické pozastavení a terminace transkripce u eRNAP I za normálních okolností vyžaduje přítomnost DNA vazebného proteinu, ale bylo pozorováno, že při použití terminátoru *lac* represoru pro pozastavení EC je eRNAP I schopná terminace transkripce i bez přítomnosti DNA vazebného faktoru Reblp *in vitro* (LANG a REEDER 1995).

4.2 Vnitřní terminace transkripce u archea

Archeální RNAP je strukturně nejvíce podobná eRNAP II, avšak mechanismus terminace transkripce je podobný spíše bRNAP a/nebo eRNAP III (KORKHIN *et al.* 2009). RNAP *Methanothermobacter thermautotrophicus* využívá terminátor obsahující invertovanou sekvenci, schopnou vytvořit RNA vlásenku následovanou U-oblastí, který je tedy velmi podobný bakteriálním terminačním sekvencím. Přítomnost sekvence schopné vytvořit RNA vlásenku ale pro terminaci transkripce není nezbytná a vzhledem k vysokým teplotám, ve kterých mnohá archea žijí, se zdá být využití sekundárních struktur RNA pro terminaci transkripce nepravděpodobné (SANTANGELO a REEVE 2006; SANTANGELO *et al.* 2009).

Terminace transkripce je u archea ve většině případů iniciována jen samotnou U-oblastí a oproti bakteriím nekončí jen na dvou definovaných nukleotidech U-oblasti, ale na více různých místech, včetně oblastí, kde se nevyskytuje slabé párování bází DNA:RNA hybridní molekuly (SANTANGELO *et al.* 2009). Vzhledem k postradatelnosti sekvencí schopných tvořit RNA vlásenku u archeálních terminátorů, tak zřejmě strukturní změny v EC aRNAP zodpovědné za terminaci transkripce nejsou způsobeny RNA vlásenkou a nejsou ani žádné důkazy pro posun nascentní RNA v EC aRNAP (SANTANGELO *et al.* 2009). Sekvenčně specifické pozastavení a terminace transkripce aRNAP se zdá být závislá i na topologii DNA, a terminace transkripce se zdá být ovlivněna sekvencemi DNA proti směru transkripce ve velkých vzdálenostech (až více než 200 bp), což doposud není vysvětleno (SANTANGELO a REEVE 2006).

Analýza transkriptů genetického elementu pSSVx z *Sulfolobus islandicus*, což je hybrid mezi plasmidem a fusellovirem, pomocí RT-PCR ukázala, že terminující U-oblast je obklopena několika dalšími, kratšími U-oblastmi, které pravděpodobně slouží ke zpomalení EC (CONTURSI *et al.* 2010). Dále bylo zjištěno, že za některými otevřenými čtecími rámci pSSVx nenásleduje U-oblast, ale jen invertovaná repetice, která je schopná vytvořit RNA vlásenku s relativně nízkou termodynamickou stabilitou v 75 °C s purin/U bohatou oblastí, která možná částečně zasahuje do sekvence tvořící stonek RNA vlásenky nebo je těsně

za vlásenkou po směru transkripce (CONTURSI *et al.* 2010). Terminační oblasti, obsahující předpokládanou RNA vlásenku, jsou v blízkosti transkripčních iniciačních míst přilehlých otevřených čtecích rámců. Inicie transkripce v blízkosti terminačního místa může způsobit zpomalení terminujícího EC aRNAP a umožnit sestavení RNA vlásenky, která by destabilizovala EC, což by vedlo k disociaci (CONTURSI *et al.* 2010). Znemožnění iniciace transkripce otevřených čtecích rámců, přilehlých k terminačnímu místu obsahujícímu předpokládanou RNA vlásenku, vede ke snížení efektivity terminace transkripce a umožňuje pročtení terminační sekvence, což podporuje tento model druhého, alternativního mechanismu terminace transkripce u archea (CONTURSI *et al.* 2010).

Díky detailnímu zmapování 3' RNA konců transkriptů a charakterizaci terminačních sekvencí u *Methanosarcina mazei* a *Sulfolobus acidocaldarius* (zástupci z rozdílných archeálních kmenů) byly kromě U-oblasti nalezeny i další, dříve nepopsané terminační signály, charakterizované G chudou oblastí proti směru transkripce od terminačního místa a nepřítomností U na pozici +1 po směru transkripce u *Methanosarcina mazei* a druhou distální U-oblastí, lokalizovanou proti směru transkripce v pozici -20 až -12 u *Sulfolobus acidocaldarius* (DAR *et al.* 2016). V případě *Methanosarcina mazei* byl zhruba v polovině případů v blízkosti terminačních míst detekován zvýšený výskyt predikovaných sekundárních struktur RNA, které by mohly přispívat k efektivitě terminace transkripce, jak již bylo ukázáno *in vitro* (SANTANGELO a REEVE 2006; DAR *et al.* 2016). Dále bylo dokázáno, že mnoho archeálních genů má několik terminátorů, což naznačuje, že aRNAP terminační sekvenci vždy nerozpoznává a před disociací EC může dojít k pročtení několika terminátorů. Více terminačních míst u jednoho genu by mohlo být využito pro různou expresi genů přepisovaných z jednoho promotoru (DAR *et al.* 2016). Je možné, že opakované terminační sekvence se vyskytují u genů, u nichž je terminace transkripce inhibována sekvencí DNA proti směru transkripce (SANTANGELO a REEVE 2006; DAR *et al.* 2016). Vnitřní terminace transkripce u archea má tedy malou efektivitu, a/nebo může docházet k regulaci terminace transkripce dosud neznámým způsobem (DAR *et al.* 2016).

Archea mají oproti bakteriím delší 3' nepřekládané oblasti (UTR). Dlouhé 3' UTR oblasti jsou typické pro eukaryota, u kterých tyto oblasti zajišťují různé způsoby genové regulace pro mRNA, což naznačuje možné způsoby genové regulace u archea, které jsou závislé na jednotlivých transkripčních izoformách (DAR *et al.* 2016).

Terminace transkripce genů u *Sulfolobus acidocaldarius* se často vyskytuje až v kódující oblasti přilehlého genu po směru transkripce, lokalizovaného na opačném vlákně

DNA, což může způsobit komplementární přesahy transkriptů těchto dvou genů a naznačuje možné využití specifického terminačního místa pro genovou regulaci prostřednictvím *antisense* RNA. Regulační mechanismy založené na komplementaritě RNA transkriptů jsou běžně využívány u bakterií (DAR *et al.* 2016).

I když mechanismus terminace transkripce bRNAP a aRNAP má podobné prvky, disociace EC aRNAP na U-oblasti pravděpodobně probíhá jiným mechanismem, který dosud nebyl popsán (SANTANGELO a REEVE 2006).

5 Závěr

Tato práce popisuje různé, v dnešní době diskutované, modely mechanismů vnitřní terminace transkripce u bakterií a udává stručný přehled vnitřní terminace transkripce u eukaryot (roslinné RNA polymerázy IV a V nejsou zahrnuty) a archea a porovnání s bakteriálním mechanismem vnitřní terminace transkripce.

Nejméně prostudovaným aspektem týkajícím se tohoto tématu je vliv konformačních změn RNAP na vnitřní terminaci transkripce. Jsou známy mobilní části RNAP, jejichž strukturní změny doprovází vnitřní terminaci transkripce a ovlivňují její efektivitu, ale není známo, jakým způsobem jednotlivé části RNAP k terminaci transkripce přispívají. V tomto ohledu se do budoucna izolace a biochemická a strukturní charakterizace intermediátů terminačních elongačních komplexů jeví jako důležitá.

Není také známá přesná role RNA vlásenky v terminaci transkripce. Zatímco pro hypertranslokaci a stříhání DNA:RNA hybridní molekuly je primární determinantou nestability elongačního komplexu role RNA vlásenky na zkrácení délky DNA:RNA hybridní molekuly, v alosterickém modelu je nestabilita elongačního komplexu způsobena přímým vlivem RNA vlásenky na strukturu RNAP (PORRUA *et al.* 2016).

Dosud není jasné, zda během vnitřní terminace transkripce dochází k nevratné inaktivaci EC. Inaktivace EC by měla nastat po dokončení terminační vlásenky, což se ale vylučuje s pozorovaným zvýšením efektivitu vnitřní terminace transkripce *in vivo* při přítomnosti A-oblasti proti směru transkripce od terminační vlásenky. Sledování vlivu různých faktorů stabilizujících EC, jako například NusA při přítomnosti A-oblasti proti směru transkripce *in vitro*, by mohlo objasnit, zda A-oblast zvyšuje efektivitu vnitřní terminace transkripce urychlením disociace EC před možnou reaktivací EC, zprostředkovanou elongačními faktory *in vivo* (RAY-SONI *et al.* 2016).

Jelikož vnitřní terminace transkripce je zahrnuta u všech tří buněčných větví života, s různými podobnostmi ale i rozdíly, je předpokládáno, že mechanismus vnitřní terminace transkripce mohl být původním mechanismem, využívaným posledním universálním společným předkem (LUCA) buněčného života, který byl později nahrazen proteinovými faktory. V rané fázi vývoje RNA polymeráz bylo hodně využíváno funkčních RNA struktur (například ribozomální RNA nebo tRNA, které přetrvávají dodnes) s bohatými sekundárními strukturami a mechanismus vnitřní terminace transkripce, využívající sekundární struktury RNA, mohl sloužit jako jednoduchý kontrolní bod správného složení RNA (ZENKIN 2014).

Seznam použité literatury

Review vyznačeny tučně.

- Archambault, J., Friesen, J. D. (1993): Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III. *Microbiol Rev*, 57(3), 703-724.**
- Arimbasseri, A. G., Kassavetis, G. A., Maraia, R. J. (2014): Transcription. Comment on "Mechanism of eukaryotic RNA polymerase III transcription termination". *Science*, 345(6196), 524.**
- Arimbasseri, A. G., Maraia, R. J. (2015): Mechanism of Transcription Termination by RNA Polymerase III Utilizes a Non-template Strand Sequence-Specific Signal Element. *Mol Cell*, 58(6), 1124-1132.**
- Bar-Nahum, G., Epshtein, V., Ruckenstein, A. E., Rafikov, R., Mustaev, A., Nudler, E. (2005): A ratchet mechanism of transcription elongation and its control. *Cell*, 120(2), 183-193.**
- Braglia, P., Percudani, R., Dieci, G. (2005): Sequence context effects on oligo(dT) termination signal recognition by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III. *J Biol Chem*, 280(20), 19551-19562.**
- Contursi, P., Cannio, R., She, Q. (2010): Transcription termination in the plasmid/virus hybrid pSSVx from *Sulfolobus islandicus*. *Extremophiles*, 14(5), 453-463.**
- Cozzarelli, N. R., Gerrard, S. P., Schlissel, M., Brown, D. D., Bogenhagen, D. F. (1983): Purified RNA polymerase III accurately and efficiently terminates transcription of 5S RNA genes. *Cell*, 34(3), 829-835.**
- Cramer, P., Bushnell, D. A., Kornberg, R. D. (2001): Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science*, 292(5523), 1863-1876.**
- d'Aubenton Carafa, Y., Brody, E., Thermes, C. (1990): Prediction of rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators. A statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J Mol Biol*, 216(4), 835-858.**
- Dar, D., Prasse, D., Schmitz, R. A., Sorek, R. (2016): Widespread formation of alternative 3' UTR isoforms via transcription termination in archaea. *Nat Microbiol*, 1(10), 16143.**
- de Hoon, M. J., Makita, Y., Nakai, K., Miyano, S. (2005): Prediction of transcriptional terminators in *Bacillus subtilis* and related species. *PLoS Comput Biol*, 1(3), e25.**
- Epshtein, V., Cardinale, C. J., Ruckenstein, A. E., Borukhov, S., Nudler, E. (2007): An allosteric path to transcription termination. *Mol Cell*, 28(6), 991-1001.**
- Epshtein, V., Mustaev, A., Markovtsov, V., Bereshchenko, O., Nikiforov, V., Goldfarb, A. (2002): Swing-gate model of nucleotide entry into the RNA polymerase active center. *Mol Cell*, 10(3), 623-634.**
- Farnham, P. J., Platt, T. (1981): Rho-independent termination: dyad symmetry in DNA causes RNA polymerase to pause during transcription in vitro. *Nucleic Acids Res*, 9(3), 563-577.**
- Gnatt, A. L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. A., Kornberg, R. D. (2001): Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*, 292(5523), 1876-1882.**
- Gusarov, I., Nudler, E. (1999): The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol Cell*, 3(4), 495-504.**
- Hein, P. P., Kolb, K. E., Windgassen, T., Bellecourt, M. J., Darst, S. A., Mooney, R. A., Landick, R. (2014): RNA polymerase pausing and nascent-RNA structure formation are linked through clamp-domain movement. *Nat Struct Mol Biol*, 21(9), 794-802.**
- Chan, C. L., Landick, R. (1993): Dissection of the his leader pause site by base substitution reveals a multipartite signal that includes a pause RNA hairpin. *J Mol Biol*, 233(1), 25-42.**

- Cheeran, A., Babu Suganthan, R., Swapna, G., Bandey, I., Achary, M. S., Nagarajaram, H. A., Sen, R.** (2005): Escherichia coli RNA polymerase mutations located near the upstream edge of an RNA:DNA hybrid and the beginning of the RNA-exit channel are defective for transcription antitermination by the N protein from lambdoid phage H-19B. *J Mol Biol*, 352(1), 28-43.
- Chen, Y. J., Liu, P., Nielsen, A. A., Brophy, J. A., Clancy, K., Peterson, T., Voigt, C. A.** (2013): Characterization of 582 natural and synthetic terminators and quantification of their design constraints. *Nat Methods*, 10(7), 659-664.
- Kashlev, M., Komissarova, N.** (2002): Transcription termination: primary intermediates and secondary adducts. *J Biol Chem*, 277(17), 14501-14508.
- Komissarova, N., Becker, J., Solter, S., Kireeva, M., Kashlev, M.** (2002): Shortening of RNA:DNA hybrid in the elongation complex of RNA polymerase is a prerequisite for transcription termination. *Mol Cell*, 10(5), 1151-1162.
- Komissarova, N., Kashlev, M.** (1997): RNA polymerase switches between inactivated and activated states By translocating back and forth along the DNA and the RNA. *J Biol Chem*, 272(24), 15329-15338.
- Komissarova, N., Kashlev, M.** (1998): Functional topography of nascent RNA in elongation intermediates of RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25), 14699-14704.
- Korkhin, Y., Unligil, U. M., Littlefield, O., Nelson, P. J., Stuart, D. I., Sigler, P. B., Bell, S. D., Abrescia, N. G.** (2009): Evolution of complex RNA polymerases: the complete archaeal RNA polymerase structure. *PLoS Biol*, 7(5), e1000102.
- Korzheva, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A., Darst, S. A.** (2000): A structural model of transcription elongation. *Science*, 289(5479), 619-625.
- Lane, W. J., Darst, S. A.** (2010): Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: structural analysis. *J Mol Biol*, 395(4), 686-704.
- Lang, W. H., Reeder, R. H.** (1995): Transcription termination of RNA polymerase I due to a T-rich element interacting with Reb1p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(21), 9781-9785.
- Larson, M. H., Greenleaf, W. J., Landick, R., Block, S. M.** (2008): Applied force reveals mechanistic and energetic details of transcription termination. *Cell*, 132(6), 971-982.
- Lee, D. N., Phung, L., Stewart, J., Landick, R.** (1990): Transcription pausing by Escherichia coli RNA polymerase is modulated by downstream DNA sequences. *J Biol Chem*, 265(25), 15145-15153.
- Lubkowska, L., Maharjan, A. S., Komissarova, N.** (2011): RNA folding in transcription elongation complex: implication for transcription termination. *J Biol Chem*, 286(36), 31576-31585.
- Martin, F. H., Tinoco, I., Jr.** (1980): DNA-RNA hybrid duplexes containing oligo(dA:rU) sequences are exceptionally unstable and may facilitate termination of transcription. *Nucleic Acids Res*, 8(10), 2295-2299.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H., Severinov, K.** (2001): Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(3), 892-897.
- Mitra, A., Angamuthu, K., Jayashree, H. V., Nagaraja, V.** (2009): Occurrence, divergence and evolution of intrinsic terminators across eubacteria. *Genomics*, 94(2), 110-116.
- Neuman, K. C., Abbondanzieri, E. A., Landick, R., Gelles, J., Block, S. M.** (2003): Ubiquitous transcriptional pausing is independent of RNA polymerase backtracking. *Cell*, 115(4), 437-447.
- Nielsen, S., Yuzenkova, Y., Zenkin, N.** (2013): Mechanism of eukaryotic RNA polymerase III transcription termination. *Science*, 340(6140), 1577-1580.

- Nielsen, S., Zenkin, N.** (2014): Transcription. Response to Comment on "Mechanism of eukaryotic RNA polymerase III transcription termination". *Science*, 345(6196), 524.
- Nudler, E., Avetisova, E., Markovtsov, V., Goldfarb, A.** (1996): Transcription processivity: protein-DNA interactions holding together the elongation complex. *Science*, 273(5272), 211-217.
- Nudler, E., Mustaev, A., Lukhtanov, E., Goldfarb, A.** (1997): The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell*, 89(1), 33-41.
- Penno, C., Sharma, V., Coakley, A., O'Connell Motherway, M., van Sinderen, D., Lubkowska, L., Kireeva, M. L., Kashlev, M., Baranov, P. V., Atkins, J. F.** (2015): Productive mRNA stem loop-mediated transcriptional slippage: Crucial features in common with intrinsic terminators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(16), E1984-1993.
- Peters, J. M., Vangeloff, A. D., Landick, R.** (2011): Bacterial transcription terminators: the RNA 3'-end chronicles. *J Mol Biol*, 412(5), 793-813.
- Porrua, O., Boudvillain, M., Libri, D.** (2016): Transcription Termination: Variations on Common Themes. *Trends Genet*, 32(8), 508-522.
- Ray-Soni, A., Bellecourt, M. J., Landick, R.** (2016): Mechanisms of Bacterial Transcription Termination: All Good Things Must End. *Annu Rev Biochem*, 85, 319-347.
- Rosenberg, M., Court, D.** (1979): Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu Rev Genet*, 13, 319-353.
- Santangelo, T. J., Cubonova, L., Skinner, K. M., Reeve, J. N.** (2009): Archaeal intrinsic transcription termination in vivo. *J Bacteriol*, 191(22), 7102-7108.
- Santangelo, T. J., Reeve, J. N.** (2006): Archaeal RNA polymerase is sensitive to intrinsic termination directed by transcribed and remote sequences. *J Mol Biol*, 355(2), 196-210.
- Santangelo, T. J., Roberts, J. W.** (2004): Forward translocation is the natural pathway of RNA release at an intrinsic terminator. *Mol Cell*, 14(1), 117-126.
- Sekine, S., Murayama, Y., Svetlov, V., Nudler, E., Yokoyama, S.** (2015): The ratcheted and ratchetable structural states of RNA polymerase underlie multiple transcriptional functions. *Mol Cell*, 57(3), 408-421.
- Sidorenkov, I., Komissarova, N., Kashlev, M.** (1998): Crucial role of the RNA:DNA hybrid in the processivity of transcription. *Mol Cell*, 2(1), 55-64.
- Touloukhonov, I., Artsimovitch, I., Landick, R.** (2001): Allosteric control of RNA polymerase by a site that contacts nascent RNA hairpins. *Science*, 292(5517), 730-733.
- Touloukhonov, I., Landick, R.** (2003): The flap domain is required for pause RNA hairpin inhibition of catalysis by RNA polymerase and can modulate intrinsic termination. *Mol Cell*, 12(5), 1125-1136.
- Touloukhonov, I., Landick, R.** (2006): The role of the lid element in transcription by E. coli RNA polymerase. *J Mol Biol*, 361(4), 644-658.
- Vassilyev, D. G., Vassilyeva, M. N., Perederina, A., Tahirov, T. H., Artsimovitch, I.** (2007): Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature*, 448(7150), 157-162.
- von Hippel, P. H., Yager, T. D.** (1992): The elongation-termination decision in transcription. *Science*, 255(5046), 809-812.
- Wang, D., Bushnell, D. A., Westover, K. D., Kaplan, C. D., Kornberg, R. D.** (2006): Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell*, 127(5), 941-954.

- Washio, T., Sasayama, J., Tomita, M.** (1998): Analysis of complete genomes suggests that many prokaryotes do not rely on hairpin formation in transcription termination. *Nucleic Acids Res*, 26(23), 5456-5463.
- Watson, J. B., Chandler, D. W., Gralla, J. D.** (1984): Specific termination of in vitro transcription by calf thymus RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res*, 12(13), 5369-5384.
- Weilbaecher, R., Hebron, C., Feng, G., Landick, R.** (1994): Termination-altering amino acid substitutions in the beta' subunit of Escherichia coli RNA polymerase identify regions involved in RNA chain elongation. *Genes Dev*, 8(23), 2913-2927.
- Weixlbaumer, A., Leon, K., Landick, R., Darst, S. A.** (2013): Structural basis of transcriptional pausing in bacteria. *Cell*, 152(3), 431-441.
- Westover, K. D., Bushnell, D. A., Kornberg, R. D.** (2004): Structural basis of transcription: separation of RNA from DNA by RNA polymerase II. *Science*, 303(5660), 1014-1016.
- Wilson, K. S., von Hippel, P. H.** (1994): Stability of Escherichia coli transcription complexes near an intrinsic terminator. *J Mol Biol*, 244(1), 36-51.
- Wilson, K. S., von Hippel, P. H.** (1995): Transcription termination at intrinsic terminators: the role of the RNA hairpin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(19), 8793-8797.
- Woodside, M. T., Behnke-Parks, W. M., Larizadeh, K., Travers, K., Herschlag, D., Block, S. M.** (2006): Nanomechanical measurements of the sequence-dependent folding landscapes of single nucleic acid hairpins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(16), 6190-6195.
- Yarnell, W. S., Roberts, J. W.** (1999): Mechanism of intrinsic transcription termination and antitermination. *Science*, 284(5414), 611-615.
- Yin, H., Artsimovitch, I., Landick, R., Gelles, J.** (1999): Nonequilibrium mechanism of transcription termination from observations of single RNA polymerase molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(23), 13124-13129.
- Zenkin, N.** (2014): Ancient RNA stems that terminate transcription. *RNA Biol*, 11(4), 295-297.
- Zhang, G., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., Darst, S. A.** (1999): Crystal structure of Thermus aquaticus core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*, 98(6), 811-824.
- Zhang, L., Silva, D. A., Pardo-Avila, F., Wang, D., Huang, X.** (2015): Structural Model of RNA Polymerase II Elongation Complex with Complete Transcription Bubble Reveals NTP Entry Routes. *PLoS Comput Biol*, 11(7), e1004354.